

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭63-206652

⑥ Int.Cl.<sup>4</sup>G 01 N 31/22  
33/52

識別記号

1 2 1

庁内整理番号

G-8506-2G  
B-8305-2G

⑬ 公開 昭和63年(1988)8月25日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全5頁)

⑭ 発明の名称 多層分析素子およびそれを用いた生体由来の試料分析法

⑰ 特 願 昭62-40970

⑱ 出 願 昭62(1987)2月24日

⑲ 発 明 者 川 崎 隆 志 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東電気工業株式会社内

⑳ 出 願 人 日 東 電 工 株 式 有 限 公 司 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号

㉑ 代 理 人 弁 理 士 山 本 秀 策

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

多層分析素子およびそれを用いた生体由来の試料分析法

## 2. 特許請求の範囲

1. 吸収層と光不透過性の試薬層とを順次積層しかつ該吸収層と該試薬層との間に、少なくとも一枚の液体不透過性フィルムが取りはずし可能に挿入された構成でなる多層分析素子。

2. 吸収層と光不透過性の試薬層とが順次積層されかつ該吸収層と該試薬層との間に少なくとも一枚の液体不透過性フィルムが取りはずし可能に挿入された構成でなる多層分析素子の該試薬層上に生体由来の試料を点着し、試薬層に浸透した該点着試料を試薬層中の試薬および/または該点着後に試薬層に供給された試薬と反応させ、反応が完結したのち該液体不透過性フィルムを取りはずすことにより、未反応物を次の吸収層に供給すること、および

該試薬層に、必要に応じて洗浄液を供給して反

応物を洗浄した後、この試薬層に試薬を供給して該反応物と反応させること、

を包含する生体由来の試料分析法。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、多層分析素子、特に吸収層と試薬層との間に液体不透過性フィルムを設けた多層分析素子およびそれを用いた生体由来の試料分析法に関する。

(従来技術)

血液や尿などの生体由来の液体試料の定量分析には、フロー方式およびディスクリット方式などの自動定量分析装置が用いられている。この装置は分析処理能力が高いものの使用前のウォーミングアップおよび使用後の洗浄が必要である。洗浄廃液の処理には環境汚染上の問題もある。装置が高価であるうえにその操作に熟練を要するという問題もある。

これら欠点を解決するために、多層分析素子を用いた光学的方法による生体由来の液体試料の定

量分析法が提案されている。多層分析素子とは、生体由来の液体試料中の特定化学成分を、乾式で、迅速かつ簡単に定量する材料であり、例えば、特開昭49-53888号公報、特開昭50-137192号公報、特開昭51-40191号公報、特開昭52-131786号公報、特開昭53-89796号公報および特開昭55-26428号公報に開示されている。

この多層分析素子に生体由来の液体試料を点着し、その色変化または濃度変化を肉眼判定または反射測光することにより、試料中の被検成分が定量分析される。

しかし、生体由来の試料と素子中の試薬との反応が、抗原抗体反応のような反応速度の遅い反応である場合、反応が完結しない状態の反応液が次の吸収層に移動するときがあり、そのために、分析精度が低下し、試料の定量が不正確となる。

(発明が解決しようとする問題点)

本発明は上記従来の問題点を解決するものであり、その目的とするところは、被検成分と試薬との反応が抗原抗体反応のような反応速度の遅い反

応の場合においても、反応を完結させてのち所定の分析に供する多層分析素子を提供するところにある。本発明の他の目的は、上記多層分析素子を用いた生体由来の試料分析法を提供するところにある。

(問題点を解決するための手段)

本発明の多層分析素子は、吸収層と光不透過性の試薬層とを順次積層しかつ該吸収層と該試薬層との間に、少なくとも一枚の液体不透過性フィルムが取りはずし可能に挿入された構成であり、そのことにより上記目的が達成される。本発明の多層分析素子を用いた生体由来の試料分析法は、吸収層と光不透過性の試薬層とが順次積層されかつ該吸収層と該試薬層との間に少なくとも一枚の液体不透過性フィルムが取りはずし可能に挿入された構成である多層分析素子の該試薬層上に生体由来の試料を点着し、試薬層に浸透した該点着試料を試薬層中の試薬および／または該点着後に試薬層に供給された試薬と反応させ、反応が完結したのち該液体不透過性フィルムを取りはずすことに

3

より、未反応物を次の吸収層に供給すること、および該試薬層に、必要に応じて洗浄液を供給して反応物を洗浄した後、この試薬層に試薬を供給して該反応物と反応させること、を包含し、そのことにより上記目的が達成される。

本発明の試薬層は、例えば、被検試料と反応する試薬を含有する層であり、光不透過性の素材、例えば、メンブランフィルター、布、濾紙、不織布、ガラス繊維などが用いられる。この試薬層は、試薬および酵素の少なくとも一方を、その内部および表面に吸収あるいは吸着、固定させることにより、作製される。試薬層を光不透過性の素材とすれば、光が遮断されるため試薬が光分解を受けにくいだけでなく、試料中の成分の色（例えば、ヘモグロビンの赤色）を遮断でき、光遮断層としての効果も付加し得る。これら素材は多孔質であるため、試薬の含浸も容易となる。しかし、試薬層には、必ずしも最初からすべての試薬を含浸させる必要はない。試料点着前に試薬層上に試薬が供給されてもよい。

5

4

吸収層は、試薬層における反応の未反応物を吸収するための層である。この未反応物は、一旦吸収層に吸収された後、試薬層に供給された洗浄液とともに除去される。吸収層には、例えば、メンブランフィルター、布、濾紙、不織布、ガラス繊維などが用いられる。これら素材は、試薬層と同一であってもよい。

上記吸収層と試薬層との間に配置される液体不透過性フィルムは、例えば、抗原抗体反応のような反応速度の遅い反応において、反応を完結させて後、反応物と未反応物とを分離するべく、試薬層を吸収層と遮断するための層であり、取りはずし可能である。このフィルムには、液体不透過性のあらゆる材料が使用でき、その例には、ポリエチレンテレフタレート、三酢酸セルロース、ポリカーボネート、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレートおよびガラスがある。フィルムの厚さは、可能なかぎり薄い方が好ましい。一般に、10～200 $\mu$ mである。このフィルムは薄膜であるため、これを取りはずした後も、通

6

常、フィルム設置箇所に空隙が生じることはなく、分析に支障をきたさない。上記フィルム設置箇所の取りはずし口に接着層を設けることにより、空隙の発生を効果的に防ぐことができる。

上記多層分析素子には、必要に応じて、界面活性剤が添加されうる。界面活性剤は、素子中での試料成分の移動を促進する。その例には、ポリオキシエチレン、ポリグリセリンのアルキルアリルエーテル、ソルビタンエステル、脂肪酸エステルなどのノニオン性界面活性剤がある。

本発明の多層分析素子は、保型のためプラスチックマウントに組み込まれてもよい。

#### (実施例)

以下に本発明を実施例について述べる。

#### 実施例 1

本発明の多層分析素子は、第1図に示すように、吸収層1、液体不透過性フィルム3および試薬層2を、公知の方法により順次積層して作製される。フィルム3には取りはずし用把手30が適宜設けられる。各層には以下の材料が用いられた。

7

ンおよび1,7-ジヒドロキシナフタレンを含有する発色液を加えて、パーオキシダーゼ（上記抗インシュリン抗体の標識物質）による発色を行った。  
(6)分光光度計を用いて、素子の吸光度を測定した。

他方、既知量のインシュリンを含む溶液を用いて、上記と同様の反応を行わせ、吸光度とインシュリン量との関係を求めて検量線を作成した。

被検試料の上記吸光度測定値を用いて、検量線から、被検試料中のインシュリンを定量した。

#### 実施例 2

吸収層1：ガラスファイバー濾紙（日本理化学器械社製）。

試薬層2：ポリスチレンでコートした表面に抗HCG抗体を固定化したガラスフィルター。

この多層分析素子を用いて、妊婦尿中のHCGが次のようにして半定量的に測定された。

(1)試薬層に妊婦の尿を点着した。

(2)次に、パーオキシダーゼにて標識したHCG溶液をさらに試薬層に加え、37℃で30分間抗原抗体

吸収層1：No.5A濾紙（東洋濾紙社製）を5枚重ねた。

試薬層2：抗インシュリン抗体を固定化したマイクロフィルター。

この多層分析素子を用いて、ヒト血清中のインシュリンの定量が、次のようにして行われた。

(1)パーオキシダーゼで標識した過剰量の抗インシュリン抗体とヒト血清（被検試料）との混合溶液を、上記多層分析素子の試薬層上に点着した。

(2)このようにして供給された標識抗インシュリン抗体と血清中のインシュリンは、固定化抗インシュリンと反応して複合体を形成する。37℃で60分間反応させた。この反応は液体不透過性フィルム上で行われる。

(3)反応後、液体不透過性フィルムを取りはずした。反応物は試薬層2中に残留し、未反応物だけが吸収層1に移動した。

(4)次に、pH=8.0、0.01モルのリン酸バッファーを試薬層2上に点着し、洗浄した。洗浄後、この試薬層に、過酸化水素、4-アミノアンチビリ

8

反応をさせた。

(3)反応後、液体不透過性フィルムを取りはずした。反応物は試薬層2中に残留し、未反応物は吸収層1に移動した。

(4)実施例1と同様にして、洗浄および発色を行い、着色の濃さを肉眼にて観察することにより、HCGが尿中に存在するか否かを判定した。それにより、妊婦の妊娠の有無を判定した。

#### 実施例 3

各層に以下の材料を用いたこと以外は、実施例1と同様の多層分析素子を作成した。

吸収層1：No.5A濾紙（東洋濾紙社製）を5枚重ねた。

試薬層2：抗HCG抗体を固定化したマイクロフィルター。

この多層分析素子を用いて、ヒト血清中のHCGの定量が、次のようにして行われた。

(1)パーオキシダーゼで標識した過剰量の抗HCGモノクローナル抗体とヒト血清（被検試料）との混合溶液を、上記多層分析素子の試薬層上に点着

9

10

した。

(2)このようにして供給された標識抗 HCGモノクロナール抗体と血清中の HCGは、固定化抗 HCGと反応して複合体を形成する。37℃で60分間反応させた。この反応は液体不透過性フィルム上で行われる。

(3)反応後、液体不透過性フィルムを取りはずした。反応物は試薬層 2 中に残留し、未反応物だけが吸収層 1 に移動した。

(4)次に、 $\text{pH}=8.0$ 、 $0.01$ モルのリン酸バッファを試薬層 2 上に点着し、洗浄した。洗浄後、この試薬層に、過酸化水素、4-アミノアンチピリンおよび1,7-ジヒドロキシナフタレンを含有する発色液を加えて、パーオキシダーゼ（上記抗HCGモノクロナール抗体の標識物質）による発色を行った。

(5)分光光度計を用いて、素子の吸光度を測定した。

他方、既知量の HCGを含む溶液を用いて、上記と同様の反応を行わせ、吸光度と HCG量との関係

を求めて検量線を作成した。

被検試料の上記吸光度測定値を用いて、検量線から、被検試料中の HCGを定量した。

#### 実施例 4

各層に以下の材料を用いたこと以外は、実施例 1 と同様の多層分析素子を作製した。

吸収層 1 : No 5 A 濾紙（東洋濾紙社製）を 5 枚重ねた。

試薬層 2 : 抗 HCG抗体を固定化して含有させ、かつパーオキシダーゼで標識した過剰量の抗 HCGモノクロナール抗体を固定せず含有させたミクロフィルター。

この多層分析素子を用いて、ヒト血清中の HCGの定量が、次のようにして行われた。

(1)ヒト血清（被検試料）を、上記多層分析素子の試薬層上に点着した。

(2)このようにして供給された血清中の HCGは、固定化抗 HCGおよび標識抗 HCGモノクロナール抗体と反応して複合体を形成する。37℃で60分間反応させた。この反応は液体不透過性フィルム上で

1 1

行われる。

(3)反応後、液体不透過性フィルムを取りはずした。反応物は試薬層 2 中に残留し、未反応物だけが吸収層 1 に移動した。

(4)次に、 $\text{pH}=8.0$ 、 $0.01$ モルのリン酸バッファを試薬層 2 上に点着し、洗浄した。洗浄後、この試薬層に、過酸化水素、4-アミノアンチピリンおよび1,7-ジヒドロキシナフタレンを含有する発色液を加えて、パーオキシダーゼ（上記抗HCGモノクロナール抗体の標識物質）による発色を行った。

(5)分光光度計を用いて、素子の吸光度を測定した。

他方、既知量の HCGを含む溶液を用いて、上記と同様の反応を行わせ、吸光度と HCG量との関係を求めて検量線を作成した。

被検試料の上記吸光度測定値を用いて、検量線から、被検試料中の HCGを定量した。

（発明の効果）

本発明の多層分析素子は、このように、吸収層

1 3

1 2

と光不透過性の試薬層との間に、少なくとも一枚の液体不透過性フィルムが取りはずし可能に挿入されている。そのため、生体由来の試料中の被検成分と試薬との反応が抗原抗体反応のような反応速度の遅い反応の場合でも、反応を完結させてのち被検試料中の被検成分が分析されうる。その結果、分析精度が向上し、被検成分の定量が正確になされる。

#### 4. 図面の簡単な説明

第 1 図は、本発明の多層分析素子の一実施例を示す斜視図である。

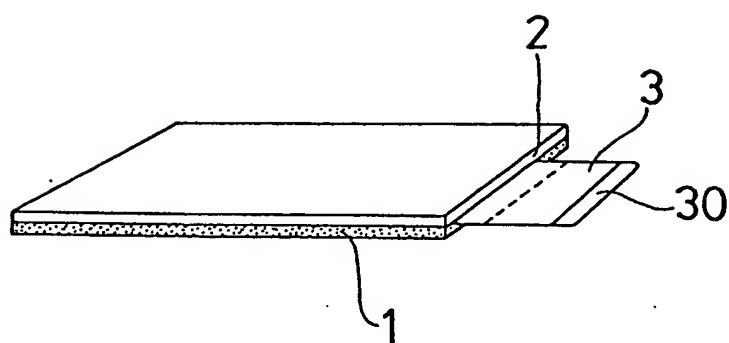
1…吸収層、2…試薬層、3…液体不透過性フィルム、30…フィルム取りはずし用把手。

以 上

代理人 弁理士 山本秀策

1 4

第 1 図



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**